

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15890

研究課題名（和文）デスモコリン2の遺伝子変異に起因する心筋症の分子機序の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanism in cardiomyopathy patients with DSC2 mutation

研究代表者

福田 昌和（FUKUDA, Masakazu）

山口大学・医学部附属病院・診療助教（4日/週）

研究者番号：30815668

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：DSC2（G790）KIマウスの作成、繁殖、genotypingに成功した。DSC2（G790）KIマウスに心電図および心エコーを行った。また、VT誘発試験や運動負荷試験を施行した。しかしDSC2（G790）KIマウスにおいて有意な不整脈の増加は認めなかった。蛍光免疫染色により、DSC2を含む様々なデスモゾーム関連蛋白の染色を行ったが、大きな変化を認めなかった。心エコーによる計測でDSC2 KIマウスは特にホモマウスにおいて軽度の心拡大と収縮性の低下を認めた。DSC2（G790）KIマウスではホモマウスにおいてややcell shorteningの低下が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DSC2 KIマウスを世界で初めて作成し、論文化できたことは学術的意義があったが、当初仮説を立てていたDSC2変異における催不整脈性や（可逆的な）細胞内Ca²⁺ハンドリング異常を誘導する可能性についてはnegativeなデータであった。

研究成果の概要（英文）：We succeeded in creating, breeding and genotyping DSC2 (G790) KI mice. DSC2 (G790) KI mice were electrocardiogram and echocardiographically. In addition, VT induction test and exercise test were performed. However, no significant increase in arrhythmia was observed in DSC2 (G790) KI mice. Fluorescent immunostaining showed no significant changes in the staining of various desmosome-related proteins including DSC2. Echocardiographic measurements revealed that DSC2 KI mice had mild dilation and reduced contractility, especially in homozygous mice. In DSC2 (G790) KI mice, a slight decrease in cell shortening was observed in homozygous mice.

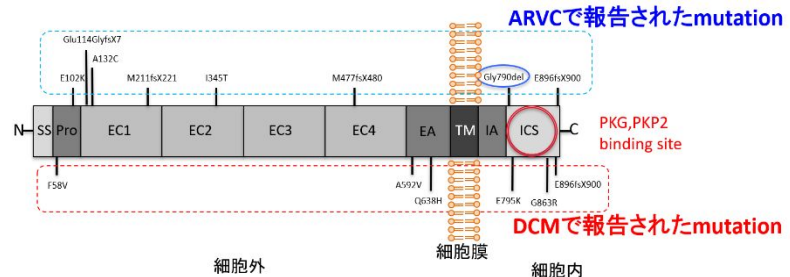
研究分野：循環器内科学

キーワード：デスモコリン デスモゾーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究は、心筋症の病態を示した家族歴のある患者から同定した DSC2 変異をマウスに遺伝子導入(ノックイン)し、その表現型を観察し、不整脈・心機能異常の機序を解明しようとするものである。DSC2 の KI マウスの報告は例がなく世界初の試みであり極めて独創的である。DSC2 KI マウスはすでに作成済みであり、患者の心エコー所見と類似した予備 data を得ていることから、DSC2 が少なくとも左室機能異常の原因遺伝子である可能性は極めて高い。研究代表者らの教室では、以前より不整脈発症基盤としてのギャップ結合リモデリングの研究や心不全時の細胞内 Ca²⁺ハンドリング異常の機序に関する研究において独創的な成果を上げており、研究代表者自身も in vivo での心臓電気生理学的検査 (EPS) や in vitro での光学的マッピング法を用いた活動電位・細胞内 Ca²⁺ transient の同時測定などの方法論に精通している。



2. 研究の目的

本研究の目的は、研究代表者の施設で経験した家族性に心不全を発症した父子の遺伝性心筋症の症例から同定されたデスモコリン-2 の遺伝子変異 (c.2368_2370del) を導入したノックイン (KI) マウス (現有) を用いて心不全、不整脈の発症機序を解明することである。原因不明の心筋症患者の遺伝子情報に基づく DSC2 遺伝子変異マウスの作製：実際の心筋症症例から同定された ARVC 関連遺伝子変異 (c.2368_2370del) を導入したマウスを用いて、心筋症の病態解明を行うことは極めて斬新かつ臨床的に意義深い。DSC2 変異マウスは既に作成済みである。予備データでは、DSC2 変異マウスは 15 週の時点ですでに WT マウスに比し軽度の心拡大と心機能低下を認めており、患者の心エコー所見と類似している。

3. 研究の方法

(1) 経胸壁心エコー、心電図、心臓電気生理学的検査および組織学的検討

作成した DSC2 (G790) KI マウスの表現型を確認するために経時的に心電図および心エコーを行う。また in vivo にて心臓電気生理学的検査 (EPS) を行い、VT 誘発試験を期外刺激法や頻回連続刺激法を用いて施行する。施行後は心臓を摘出し、心臓の組織学的性状を光顕・電顕レベルで検討する。研究代表者は、すでに WT モデルを用いた in vivo での EPS を行っている。予備実験で DSC2 KI マウスは心拡大と収縮性の低下を認めた。

(2) 単離心筋細胞を用いた Ca²⁺ transient/spark, cell shortening 測定と収縮関連蛋白の量的質的变化の解析

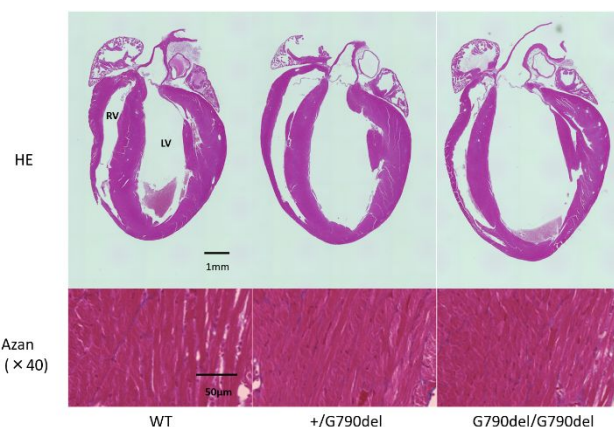
WT マウスおよび DSC2KI マウスの左室心筋細胞を単離し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて Ca²⁺ spark を測定する。また ion Optix のシステムを用い Ca²⁺ transient と cell shortening を解析する。左室心筋のホモジネートから Western blot 法にて RyR2, SERCA, PLB の量とリン酸化レベル (RyR2, PLB) を調べる。

(3) DSC2 結合型 Ca²⁺制御蛋白の同定

左室心筋のホモジネートを溶解し、DSC2 抗体にて pull down し SDS-PAGE で解析する。DSC2 KI マウスにて消失するバンドが検出されれば、膜に転写し、切り取ってトリプシン消化し、mass 解析を行うことで DSC2 の変異により pull down されなくなった Ca²⁺制御蛋白を同定する。研究代表者の仮説では、これは Ca²⁺制御蛋白あるいはそのリン酸化、脱リン酸化酵素である可能性が高い。

4. 研究成果

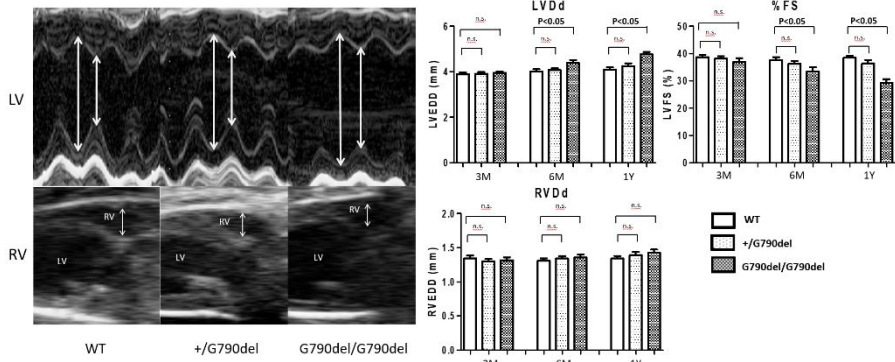
DSC2 (G790) KI マウスの作成、繁殖、genotyping に成功した。作成した DSC2 (G790) KI マウスの表現型を確認するために経時的に心電図および心エコーを行った。また、テレメトリー植え込み下に VT 誘発試験や運動負荷試験を施行した。しかし DSC2 (G790) KI マウスにおいて有意な不整脈の増加は認めなかった。施行後は心臓を摘出し、心臓の組織学的性状を光顕で検討した。組織性状は、HE, Azan の染色では大きな変化は認めず、また右室において ARVC を示唆するような所見もなかった。さらに蛍光免疫染色により、DSC2 を含む様々なデスモゾーム関連蛋白



の染色を行ったが、大きな変化を認めなかった。心エコーによる計測で DSC2 KI マウスは特にホモマウスにおいて軽度の心拡大と収縮性の低下を認めた。

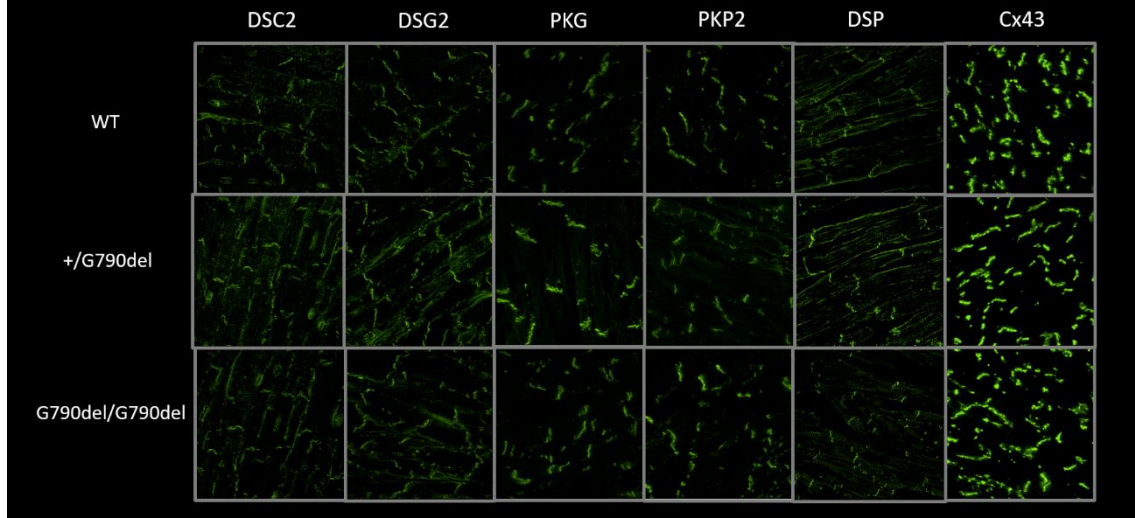
WT マウスおよび DSC2KI マウスの左室心筋細胞を単離し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて Ca²⁺ spark を測定した。また ion Optix のシステムを用い Ca²⁺ transient と cell shortening を解析した。DSC2 (G790) KI マウスではホモマウス

ホモ接合KIマウスでのみ、6ヶ月齢以降で左室拡張(LVDd)および左室短縮率(%FS)の減少が観察された。WTとKIマウスで右室径に大きな差はなかった。



スにおいてやや cell shortening の低下が認められた。左室心筋のホモジネートから Western blot 法にて RyR2, SERCA, PLB の量とリン酸化レベル(RyR2, PLB)を調べた。その結果蛋白レベルでは大きな変化は認めなかった。上記知見を論文にまとめ投稿した。

心臓凍結切片のデスモゾームタンパク質の免疫染色を生後6ヶ月齢のマウスで実施。WT、KIマウス間で、デスモゾームタンパク質の局在性に大きな違いはなかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hamada Y, Yamamoto T, Nakamura Y, Sufu-Shimizu Y, Nanno T, Fukuda M, Ono M, Oda T, Okuda S, Ueyama T, Kobayashi S, Yano M.	4. 巻 21
2. 論文標題 G790del mutation in DSC2 alone is insufficient to develop the pathogenesis of ARVC in a mouse model.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Rep	6. 最初と最後の頁 100711
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2019.100711	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi S, Myoren T, Kajii T, Kohno M, Nanno T, Ishiguchi H, Nishimura S, Fukuda M, Hino A, Fujimura T, Ono M, Uchinoumi H, Tateishi H, Mochizuki M, Oda T, Okuda S, Yoshiga Y, Kawano R, Yano M.	4. 巻 72
2. 論文標題 Addition of a 1-Blocker to Milrinone Treatment Improves Cardiac Function in Patients with Acute Heart Failure and Rapid Atrial Fibrillation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cardiology	6. 最初と最後の頁 195-202
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000499400.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----